Paarungssystem und genabhängige Paarungstypdifferenzierung bei dem hypotrichen Ciliaten *Euplotes vannus* O. F. Müller

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der

Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Eberhard-Karls-Universität

zu Tübingen

vorgelegt von

Klaus Heckmann

aus Mannheim

1962

7422

Tag der mündlichen Prüfung: 12. Juli 1962

Dekan: Professor Dr. K. G. GRELL

1. Berichterstatter: Professor Dr. K. G. GRELL

2. Berichterstatter: Professor Dr. A. KÜHN

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Abdruck aus

Archiv für Protistenkunde

Begründet von **Fritz Schaudinn**

Herausgegeben von

Karl G. Grell und **Johannes Buder**

Tübingen Halle (Saale)

106. Band, Heft 3.

JENA

VEB GUSTAV FISCHER VERLAG

1963

Satz und Druck: Druckerei „Magnus Poser" Jena

Printed in Germany

Lizenz-Nr. 1061

Arch. Protistenk. Bd. 106, S. 393— 421 (1963)

Aus dem Zoologischen Institut der Universität Tübingen
(Direktor: Prof. Dr. K. G. Grell)

Paarungssystem und genabhängige Paarungstypdifferenzierung bei dem hypotrichen Ciliaten *Euplotes vannus* O. F. Müller

Von

Klaus Heckmann

Mit 5 Abbildungen im Text

Inhalt

A. Einleitung 393
B. Material 395
C. Methoden 397
D. Verlauf der Konjugation 398
I. Paarbildung 398
II. Kernveränderungen während der Konjugation 399
E. Das Paarungssystem von *Euplotes vannus* 402
F. Determination und Erbgang der Paarungstypen 404
G. Genetische Analyse postmeiotischer Vorgänge 410
H. Diskussion 413
Zusammenfassung 417
Literatur 420

A. Einleitung

Lange Zeit nahm man an, daß bei den isogamonten Ciliaten innerhalb einer Art jedes Individuum mit jedem beliebigen anderen konjugieren kann, wenn nur die dafür notwendigen äußeren Bedingungen vorliegen. Sonneborn (1937) konnte jedoch zeigen, daß dies nicht der Fall ist. Er fand, daß bei *Paramecium aurelia* Klongeschwister normalerweise nicht miteinander konjugieren, eine Konjugation aber ausgelöst werden kann, indem man Tiere bestimmter verschiedener Klone miteinander vereinigt.

Eine solche Differenzierung in Paarungstypen wurde bald darauf auch von Jennings (1938) für *Paramecium bursaria* und Kimball (1939) für *Euplotes patella* festgestellt. Während aber für die einzelnen Varietäten[1] von *Paramecium aurelia* stets nur zwei verschiedene Paarungstypen gefunden wurden (Sonneborn 1938, 1942, 1957), gelang es für *Paramecium bursaria* innerhalb der meisten Varietäten mehr als zwei Paarungstypen nachzuweisen (Jennings 1939b, Jennings und Opitz

1) Als Varietäten werden genetisch gegeneinander isolierte Gruppen bezeichnet, die sich morphologisch nicht voneinander unterscheiden lassen (Sonneborn 1939).

1944, CHEN 1946). Auch *Euplotes patella* besitzt ein multiples Paarungssystem. Wie bei *Paramecium aurelia* und *Paramecium bursaria* tritt Konjugation normalerweise nur auf, wenn Individuen verschiedener Paarungstypen miteinander vereinigt wurden (KIMBALL 1939). Markierungsversuche ergaben jedoch, daß im Unterschied zu *Paramecium aurelia* und *Paramecium bursaria* nach dem Vereinigen auch Tiere des gleichen Paarungstyps miteinander konjugieren können.

Die genetische Analyse dieser Paarungssysteme erbrachte weitere interessante Unterschiede. So konnte SONNEBORN (1939) zeigen, daß die Determination der Paarungstypen bei *Paramecium aurelia* in einer kurzen sensiblen Phase während der Entwicklung der Makronucleusanlage zum neuen Makronucleus erfolgt und in dieser Zeit durch Außeneinflüsse modifiziert werden kann. Danach ist der Paarungstyp festgelegt; er wird bei der ungeschlechtlichen Fortpflanzung unverändert weitergegeben. Ähnliche Verhältnisse nahm man bis vor kurzem auch für *Paramecium bursaria* an (SONNEBORN 1947, 1957, NANNEY 1956). SIEGEL und LARISON (1960) gelang es jedoch, für die Varietät 1 eine genetische Determination nachzuweisen. Die vier Paarungstypen werden in dieser Varietät durch spezifische Kombinationen der Allele zweier nicht miteinander gekoppelter Genloci determiniert. Die Ergebnisse von KIMBALL (1942) machen für *Euplotes patella* ebenfalls eine genetische Determination der Paarungstypen wahrscheinlich. KIMBALL fand, daß von den Individuen eines Paarungstyps in die Kulturflüssigkeit spezifische Stoffe abgegeben werden, welche die Tiere anderer Paarungstypen zur Selbstung anregen. Kreuzungsversuche führten ihn zu der Annahme, daß für die Bildung dieser Stoffe drei Allele verantwortlich sind, welche sich unabhängig voneinander manifestieren und daß die sechs für *Euplotes patella* gefundenen Paarungstypen den sechs verschiedenen Kombinationsmöglichkeiten dieser drei codominanten Allele entsprechen.

Trotz dieser überraschenden Verschiedenartigkeit sind bisher erst wenige weitere Paarungssysteme eingehend untersucht worden (Zusammenfassung: SONNEBORN 1957). Dies ist um so erstaunlicher, als der Nachweis von Paarungstypen über diese Erscheinung hinaus eine ganze Reihe interessanter Probleme der Analyse zugänglich macht. Ist für einen Ciliaten eine Differenzierung in Paarungstypen nachgewiesen, so kann die Konjugation jederzeit ausgelöst werden. Es ist auf diese Weise möglich, die dabei stattfindenden Prozesse unter kontrollierten Bedingungen an seriiertem Material zu untersuchen, genetische Fragen durch Kreuzungsanalysen zu klären, die Rolle des Zellkerns bei den im Lebenszyklus der Ciliaten auftretenden Differenzierungsvorgängen zu erfassen und die dabei ablaufenden Wechselwirkungen zwischen Kern und Plasma zu analysieren. Fragen dieser Art sind mit großem Erfolg von SONNEBORN und seiner Schule in Angriff genommen worden (Zusammenfassungen: SONNEBORN 1947, BEALE 1954, NANNEY und RUDZINSKA 1960). Die bisherigen Ergebnisse zeigen, daß die Ciliaten sich als Objekte für Fragen der „Differenzierungsgenetik" (KÜHN 1959) in ganz besonderer Weise eignen und praktisch jede näher

untersuchte Art durch ihre Besonderheiten einen anderen Sektor dieses Problemkreises der Analyse zugänglich macht.

Für die Anregung zu dieser Arbeit und vielfache Förderung danke ich Herrn Professor Dr. KARL G. GRELL. Ich bin ferner Herrn Dr. J. FRANKEL, Kopenhagen, zu Dank verpflichtet, für das Anfertigen von Präparaten nach dem Silberimprägnationsverfahren von CHATTON und LWOFF.

B. Material

Das der Untersuchung zugrunde liegende Material stammt aus Rohkulturen von Herrn Professor GRELL, die Anfang September 1958 in der Nähe des meeresbiologischen Instituts in Rovigno (Jugoslawien) gesammelt wurden. Es geht auf fünf daraus isolierte Klone zurück, die vier verschiedenen Paarungstypen angehörten. Ein weiterer Paarungstyp trat später nach Kreuzungen auf.

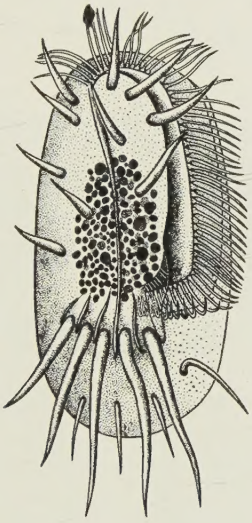
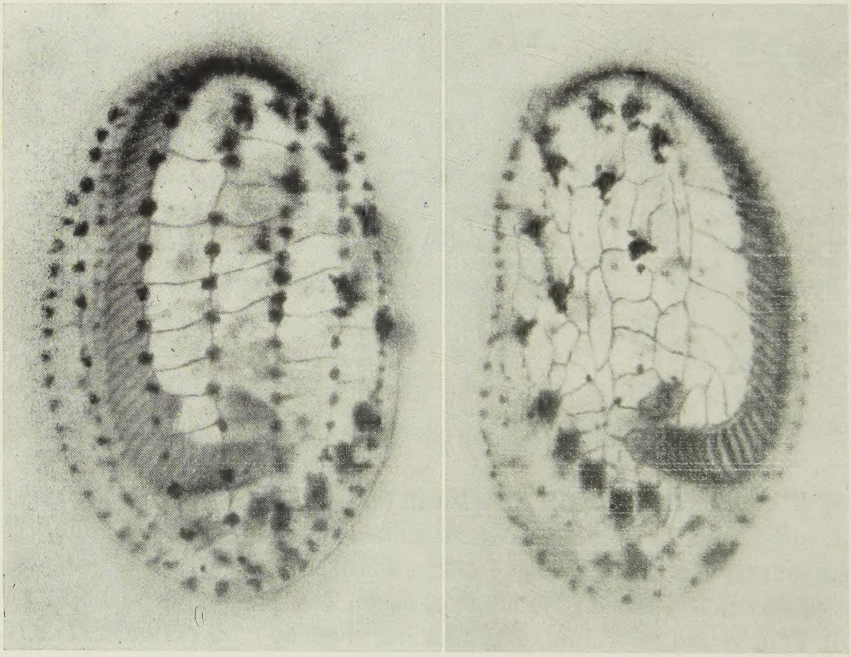


Abb. 1. *Euplotes vannus* O. F. MÜLLER.

Die Tiere stimmen mit der von KAHL (1935) für *Euplotes vannus* gegebenen Beschreibung in allen von ihm als wesentlich angesehenen Punkten überein. Sie sind aber im ganzen etwas kleiner. Ihre Länge beträgt je nach Klon 84—116 μ, ihre Breite 40—55 μ. Sie haben eine langgestreckte, fast parallelseitige Form (Abb.1, Abb. 3). Vorder- und Hinterende sind annähernd gleich breit gerundet. Der Körper ist dorsal leicht gewölbt und zeigt hier keinerlei Rippen oder Längsfurchen. Auf der Ventralseite ist er zwischen den Seitenwänden nach innen vertieft. Die dadurch gebildete Form hat dem Ciliaten seinen Artnamen „*vannus*" durch O. F. MÜLLER (1786) eingebracht. Das Peristom besitzt eine stark ausgeprägte Frontalzone, die

nach gestrecktem Verlauf neben dem linken Körperrande scharf zum Cytopharynx umbiegt. Der Frontodorsalrand überragt stets den parallel dazu verlaufenden Frontoventralrand. Auf der Ventralseite finden sich 10 starke Frontoventralcirren, 5 kräftige Transversalcirren und 4—5 wesentlich schwächere Caudalcirren. Die Zahl der Caudalcirren ist nicht konstant. Ich fand in Klonkulturen stets nebeneinander Tiere mit 4 und solche mit 5 Caudalcirren. Zwischen den 5 kräftigen Transversalcirren sind Rippen ausgebildet, von denen eine über die ganze Ventralseite weg zum rechten vorderen Rand zieht. Der im Vergleich zum Mikronucleus sehr große Makronucleus hat eine annähernd sichelförmige Gestalt. Der kugelige Mikronucleus liegt stets im linken vorderen Drittel der Tiere, meist in einer kleinen Einbuchtung des Makronucleus.

Neuerdings hat TUFFRAU (1960) die Gattung *Euplotes* einer Revision unterzogen. Da sich manche der bisher verwandten Unterscheidungsmerkmale als variabel erwiesen und eine eindeutige Zuordnung dadurch oft sehr erschwert ist, schlägt er vor, in Zukunft für die Identifizierung der einzelnen Arten neben der Zahl der Frontoventralcirren und der Form des Makronucleus, das Silberlinienbild der Dorsalseite



a b

Abb. 2. Das Silberlinienbild von *Euplotes vannus*. a) Dorsalseite, b) Ventralseite. (Die Tiere sind bei der Präparation etwas aufgequollen und zeigen daher nicht mehr die für sie typische Gestalt.) Vergr. 700×.

und die von ihm für konstant gehaltene Zahl der „cinéties latéro-dorsales“[1]) zu verwenden. Ich habe daher das Silberlinienbild meiner Tiere mit seinen Abbildungen verglichen. Dabei zeigte sich, daß meine Tiere nicht 9, sondern normalerweise 8 „cinéties latéro-dorsales“ besitzen und daß das durch die Querverbindungen gebildete Netz der Silberlinien (Abb. 2) zwar vom gleichen Typ, aber weitmaschiger ist, als dies TUFFRAU in seiner Zeichnung angibt.

C. Methoden

Die Kultur von *Euplotes vannus* erfolgte in Seewasser, das von der Biologischen Anstalt Helgoland, List auf Sylt, bezogen wurde. Das Seewasser wurde vor Gebrauch durch zweimaliges Erhitzen auf 80 °C sterilisiert. Als Futter bewährte sich besonders eine von Professor GRELL seit Jahren kultivierte marine *Dunaliella*-Art. Sie wird an künstlichem Licht in sogenanntem „Erdschreiber“ gezüchtet. Zu dessen Herstellung werden in unserem Institut 300 g gesiebte, ungedüngte Gartenerde in 1500 cm³ Seewasser bei 2 at (= 134 °C) im Autoklaven 2 Stunden erhitzt und danach noch heiß filtriert. Diese Stammlösung wird vor dem Gebrauch mit sterilisiertem Seewasser im Verhältnis 1 : 20 verdünnt. Pro 1050 cm³ Lösung werden je 1 cm³ 10%iges $NaNO_3$ und 1 cm³ 2%iges $NaHPO_4$ zugesetzt. Der pH-Wert dieser Kulturlösung liegt bei 8,4.

Die einzelnen *Euplotes*-Stämme wurden in halbkugelförmigen Glasschalen (sogenannten Abdampfschalen mit flachem Boden, Durchmesser 8 cm, Höhe 4,5 cm, Inhalt etwa 125 cm³) gehalten und einmal pro Woche gefüttert. Dabei wurde ein Teil der Tiere mit einer Glaspipette in eine neue Schale übertragen und der Rest, soweit er nicht für Kreuzungen verwandt wurde, nach einer weiteren Woche verworfen. Kreuzungen und Aufzucht der Exkonjugantenklone erfolgten in Boverischalen (Durchmesser 6,5 cm, Höhe 2,5 cm, Inhalt etwa 30 cm³). Hier wurde je nach Besetzung häufiger gefüttert, meist jeden 2. bis 3. Tag. War die Zahl der Tiere in den Schalen stark angewachsen, so wurden einige davon in eine neue Schale umgesetzt und der Rest verworfen. Alle Gefäße wurden mit runden Glasplatten von etwas größerem Durchmesser abgedeckt, um das Verdunsten der Kulturflüssigkeit und die damit verbundene Erhöhung der Salzkonzentration einzuschränken.

Für die Aufzucht der recht empfindlichen Exkonjuganten hat sich reines Seewasser als Kulturmedium nicht bewährt. Hierfür wurde später mit etwas mehr Erfolg der oben angeführte „Erdschreiber“ verwandt. Wenn trotzdem bei manchen Kreuzungen bis zu 50% der Exkonjuganten abstarben, so kann der Grund hierfür nur zum Teil in genetischen Bedingungen vermutet werden. So waren die Zuchtgefäße großenteils aus normalem stark alkali- und bleihaltigem Glas. Außerdem wirkte die von den Tieren als Futter gern genommene *Dunaliella* auf Exkonjuganten manches Mal schon in sehr großer Verdünnung toxisch, während von anderen Tieren recht hohe Futterkonzentrationen ohne Zeichen einer Schädigung vertragen wurden. Auch läßt sich schwer abschätzen, inwieweit Exkonjuganten beim Isolieren geschädigt wurden, wenn sie auch danach noch lebhaft umherschwammen.

Alle Kulturen wurden bei Temperaturen zwischen 20—23 °C gehalten.

Um die bei der Konjugation ablaufenden Prozesse in ihrem zeitlichen Verlauf zu erfassen, wurden reife Tiere von verschiedenem Paarungstyp miteinander vermischt, kurz bevor sich das Futter in beiden Ausgangskulturen erschöpfte. Auf diese Weise konnte erreicht werden, daß die Tiere nahezu gleichzeitig mit der Konjugation begannen. Für das Studium der dabei ablaufenden

1) Als „cinéties latéro-dorsales“ werden die Längslinien bezeichnet, die sich aus der Anordnung der Basalkörper ergeben.

Kernveränderungen wurden die Tiere solchen Kulturen zu bestimmten Zeiten entnommen und meist mit Sanfelice direkt auf den Objektträgern fixiert (Methode siehe RUTHMANN und HECKMANN 1961) und nach FEULGEN gefärbt. Recht gut hat sich für das Studium der Kernprozesse auch Carminessigsäure bewährt, die direkt einem möglichst kleinen Tropfen Seewasser, der die Konjugationspärchen enthielt, zugesetzt wurde. Sollten bei dieser Schnellmethode auch die Plasmastrukturen gut erhalten bleiben, so wurde mit Osmiumdampf vorfixiert.

Wie Abb. 3 zeigt, ist die Makronucleusanlage bei 24 Stunden alten Exkonjuganten von *Euplotes vannus* im Leben gut zu erkennen. Es wurden daher bei den Kreuzungsanalysen entweder solche Exkonjuganten direkt isoliert oder es wurden zunächst 8—10 Stunden alte Konjugationspärchen vereinzelt und am folgenden Tag — nachdem sich die Partner voneinander getrennt hatten — von beiden Exkonjuganten Klone angelegt. Auch in diesem Fall wurde darauf geachtet, daß die Exkonjuganten eine deutliche Makronucleusanlage zeigten. Dadurch konnten Individuen, die die Konjugation vorzeitig abgebrochen hatten, vermieden werden. Nachdem die Exkonjugantenklone herangewachsen waren und die Tiere Konjugationsbereitschaft zeigten, wurde ihr Paarungstyp festgestellt, indem Tiere solcher Klone mit Tieren der fünf Standardklone vereinigt wurden. Führte dies in vier Klongemischen zur Konjugation, so wurde dem getesteten Klon der Paarungstyp des fünften Standardklons zugesprochen, mit dessen Individuen keine Reaktion erfolgt war.

Obwohl die Klone aus den beiden ehemaligen Konjugationspartnern verschiedenen Paarungstypen angehören können, ist der Fall, daß beide dem gleichen Typ angehören, häufiger, als dies bei rein zufälliger Kombination der Gametenkerne zu erwarten wäre. Für die Beurteilung der Kreuzungsergebnisse wurde deshalb von Klonpaaren stets nur der Wert eines Exkonjugantenklons verwendet.

D. Verlauf der Konjugation

I. Paarbildung

Während Außenfaktoren wie Temperatur, Licht und Tageszeit bei *Euplotes vannus* ohne Einfluß auf das Zustandekommen einer Konjugation sind, ist neben der Differenzierung in verschiedene Paarungstypen auch ein bestimmter Ernährungszustand eine wichtige Voraussetzung. Dieser Ernährungszustand wird erreicht, wenn sich das Futter in den Kulturen gerade zu erschöpfen beginnt.

Vereinigt man reife Individuen von verschiedenem Paarungstyp zu diesem Zeitpunkt, so läßt sich trotz optimaler Bedingungen zunächst keine Veränderung im Verhalten beobachten. Die Tiere zeigen wie zuvor ein hastiges, stoßweises Laufen, das immer wieder durch ruckartige Teildrehungen nach rechts unterbrochen wird. Erst nach etwa einer Stunde werden die Zeitabstände zwischen diesen ruckartigen Drehungen kürzer und die Ciliaten beginnen nun mit einem Paarungsspiel, das dem von GRELL (1951) für *Stylonychia mytilus* beschriebenen ähnlich ist.

In der Zwischenzeit müssen sich auch an den Cirren der Tiere unter irgendeinem gegenseitigen Einfluß Veränderungen abgespielt haben. Kommen nämlich Zellen von verschiedenem Paarungstyp nun miteinander in Kontakt, so verkleben sie mit ihren Cirren. In solchen durch Verkleben gebildeten Paaren verändern die Partner ihre Stellung zueinander so lange, bis sie sich in der für die Konjugation typischen Lage befinden (Abb. 5).

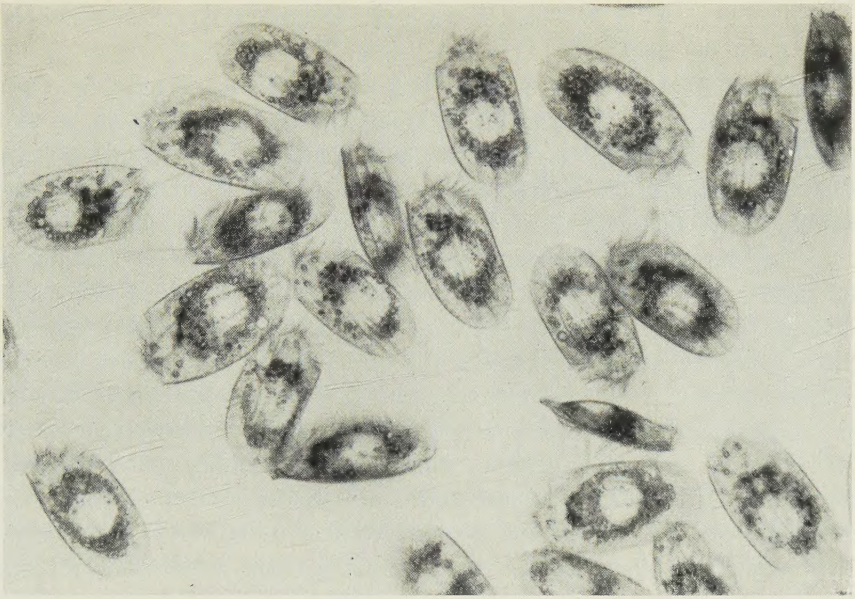


Abb. 3. Exkonjuganten 24 Stunden nach der Konjugation. Bei dem hellen, zentralen Fleck handelt es sich um die Makronucleusanlage. Lebendaufnahme, Vergr. 200×.

Während der dabei durchgeführten Drehungen kann es zu einer mechanischen Trennung der Zellen kommen. Es kann aber auch beobachtet werden, daß weitere Individuen hinzukommen und mit dem einen oder anderen der beiden Partner verkleben, so daß Aggregate aus drei bis sechs Tieren entstehen können. Ist die Kultur dicht besetzt, so kann die Zahl der Zellen, die in diesem Stadium miteinander verkleben, wesentlich größer sein. Es kann dann zur Bildung von Gruppen kommen, an denen über 50 Individuen beteiligt sind. Dies erinnert an die für *Paramecium aurelia* (Sonneborn 1937) und *Paramecium bursaria* (Jennings 1939a, 1939b) beschriebene Agglutinationsreaktion, die dort jedoch unmittelbar nach dem Vereinigen von reifen Tieren auftritt.

Wie bei den *Paramecien* lösen sich auch bei *Euplotes vannus* die Gruppen nach und nach in einzelne Paare auf. Diese schwimmen zunächst noch einige Zeit umher, wobei der Kontakt zwischen den Partnern immer fester wird. Dann läßt die Schwimmaktivität nach. Die Pärchen kommen nun meistens zur Wasseroberfläche, wo sie dann bis zum Abschluß der Konjugation ruhig liegenbleiben. Nach etwa 16—18 Stunden trennen sich die Partner voneinander.

II. Kernveränderungen während der Konjugation

Euplotes vannus besitzt im vegetativen Zustand einen sehr kleinen kugeligen Mikronucleus und einen großen sichelförmigen Makronucleus. Der Mikronucleus liegt

stets auf der linken Seite der Tiere im vorderen Drittel, meist in einer kleinen Einbuchtung des Makronucleus.

Ungefähr 4 Stunden nach Beginn der Konjugation wandert der Mikronucleus von dieser Stelle etwas nach links vom Makronucleus weg, schwillt leicht an und teilt sich ein erstes Mal. Diese Teilung gleicht in allen Einzelheiten der bei der vegetativen Vermehrung stattfindenden Mikronucleusteilung und stellt offenbar eine normale Mitose dar. Die beiden dadurch in jedem Konjuganten gebildeten Kerne schwellen stark an und durchlaufen nun eine Reihe recht charakteristischer Veränderungen, die im einzelnen schwer zu deuten sind, bei denen es sich aber um Stadien der Prophase I der Meiose handeln muß. Da TURNER (1930) für *Euplotes eurystomus*[1]) solche Stadien ausführlich beschrieben hat und seine Abbildungen mit den bei meinem Objekt beobachteten Stadien gut übereinstimmen, will ich hier von einer ausführlichen Schilderung der meiotischen Prophase absehen. Während derselben teilt sich der Makronucleus jedes Konjuganten zunächst meist in drei, später dann in fünf unterschiedlich große Brocken. Diese runden sich ab und werden pyknotisch.

Nachdem die Mikronuclei die Prophasestadien durchlaufen haben, wozu sie 8—10 Stunden benötigen, teilen sie sich zweimal rasch hintereinander. Dadurch werden in jedem Tier acht Gonenkerne gebildet, die sich auf der linken Seite der Konjuganten in einer Reihe anordnen. Von diesen acht Kernen werden durch eine offenbar nun einsetzende Plasmabewegung sechs Kerne von der linken Seite weg ins Innere der Tiere verlagert, wo sie pyknotisch werden und zugrunde gehen. Ich habe den Eindruck, daß es sich bei den beiden nicht verfrachteten Kernen normalerweise um den in den Konjuganten am weitesten vorne und den am weitesten hinten liegenden Gonenkern handelt. Diese teilen sich dann abermals. Von den vier dabei gebildeten Kernen gehen zwei zugrunde, einer wird zum Stationärkern und einer zum Wanderkern.

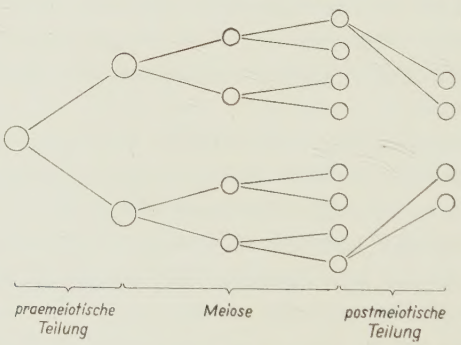


Abb. 4. Schema der progamen Kernteilungen von *Euplotes vannus*.

1) TURNER nannte seine Art *Euplotes patella*; PIERSON (1943) stellte jedoch fest, daß TURNER wahrscheinlich die nahe verwandte *Euplotes eurystomus* untersucht hat.

Die bisher beschriebenen progamen Vorgänge sind in einem Schema (Abb. 4) zusammengefaßt. Dieses berücksichtigt nicht, daß bei den Kernteilungen sich die Spindeln aneinander vorbeischieben können, so daß in den Tieren nebeneinanderliegende Kerne keine Geschwisterkerne zu sein brauchen. Da dieses Aneinandervorbeischieben aber bei *Euplotes vannus* auch nicht mit der Regelmäßigkeit erfolgt, wie dies KATASHIMA (1960) für *Euplotes patella* angibt, kann man bei *Euplotes vannus* aus der Lage der acht meist in zwei Vierergruppen hintereinander angeordneten Gonenkerne nicht mit Sicherheit auf ihre Zusammengehörigkeit schließen.

Eine offenbar für alle *Euplotes*-Arten geltende Besonderheit der progamen Vorgänge besteht darin, daß sich an der postmeiotischen Teilung zwei Gonenkerne beteiligen. Auf diese Weise entstehen vier Kerne, von denen jedoch nur zwei zu Gametenkernen werden, während die beiden anderen zugrunde gehen. Schon TURNER (1930) hat die Frage aufgeworfen, ob die beiden Gametenkerne Geschwisterkerne sind oder von verschiedenen Gonenkernen abstammen. Er schreibt: „... it has not been possible to determine whether one of the mother nuclei gives rise to both pronuclei, or whether each pronucleus is derived from a separate mother. There is some slight evidence that the latter is the case." Auch bei meinem Objekt war die Frage cytologisch nicht zu entscheiden. Die genetische Analyse ergab jedoch, daß bei *Euplotes vannus* beide Möglichkeiten verwirklicht sind (s. S. 410—413).

Dies macht aber wahrscheinlich, daß die Differenzierung in Stationär- und Wanderkern bei *Euplotes vannus* nicht an eine differentielle Kernteilung gebunden ist, wie man dies für die Ciliaten sonst ganz allgemein annimmt, sondern erst nach der Teilung, vielleicht durch die Lage in verschiedenen Plasmabezirken, erfolgt.

Nach dem Übertritt der Wanderkerne und ihrer Verschmelzung mit dem Stationärkern trennen sich die Konjuganten voneinander. Das Synkaryon teilt sich rasch zweimal, wodurch vier Kerne gebildet werden. Normalerweise gehen zwei dieser Kerne zugrunde, einer wird zum neuen Mikronucleus und der andere zur Makronucleusanlage. Stets findet man den neuen Mikronucleus in den Tieren zunächst ganz hinten, während die Makronucleusanlage etwa die Mitte der Exkonjuganten einnimmt. Nicht selten kann man beobachten, daß zwei Makronucleusanlagen ausgebildet werden. Diese wachsen dann normal heran und verschmelzen nach einiger Zeit miteinander. Gelegentlich scheint sogar keiner der vier bei den metagamen Teilungen entstehenden Kerne zu degenerieren. Ich habe einige Exkonjuganten gefunden, in denen sich drei Makronucleusanlagen entwickelten. Stets wurde aber nur ein Mikronucleus festgestellt. Da die Makronucleusanlagen auch bei lebenden Tieren leicht zu sehen sind, war es möglich, ihr weiteres Schicksal auch im Leben zu verfolgen. Wie schon oben ausgeführt, verschmolzen sie bei Exkonjuganten mit zwei Makronucleusanlagen nach einiger Zeit, so daß sich diese dann von normalen Exkonjuganten nicht mehr unterschieden. Demgegenüber waren Exkonjuganten mit drei Makronucleusanlagen stets sehr anfällig und starben nach einiger Zeit ab.

Bei etwa 4 Tage alten Exkonjuganten beginnt die runde Makronucleusanlage, die mittlerweile stark herangewachsen ist, sich in die Länge zu strecken und sich zum typischen Makronucleus umzuformen. Zu diesem Zeitpunkt findet man immer noch mehrere alte Makronucleusfragmente im vorderen Teil der Tiere. Sie sind intensiv färbbar und machen ganz den Eindruck pyknotischer Kerne. Niemals konnte ich eine Verschmelzung eines dieser Fragmente mit dem neuen Makronucleus beobachten, wie dies von TURNER (1930) für *Euplotes eurystomus* angegeben wird.

E. Das Paarungssystem von *Euplotes vannus*

Die bisher untersuchten Ciliaten zeigen in ihren Paarungssystemen eine große Verschiedenartigkeit. Während z. B. für die einzelnen Varietäten von *Paramecium aurelia* (SONNEBORN 1938, 1942, 1957) und *Euplotes eurystomus* (KATASHIMA 1959) immer nur zwei Paarungstypen gefunden wurden, hier also bipolare Systeme vorliegen, fand man für die meisten Varietäten von *Paramecium bursaria* (JENNINGS 1939b, JENNINGS und OPITZ 1944, CHEN 1946) und für *Euplotes patella* (KIMBALL 1939) multiple Systeme, d. h. innerhalb einer Varietät mehr als zwei Paarungstypen. Schwerer wiegt aber folgender Unterschied: Konjugieren bei *Paramecium aurelia* und *Paramecium bursaria* zwei Individuen miteinander, so gehören sie verschiedenen Paarungstypen an. Man prüft daher die Zugehörigkeit zu einem bestimmten Typ, indem man die zu testenden Tiere mit den Standardtypen vereinigt und feststellt, mit welchem dieser Typen keine Konjugation stattfindet. Bei *Euplotes patella* und *Euplotes eurystomus* können dagegen auch Tiere, die dem gleichen Paarungstyp angehören, miteinander konjugieren. Die Paarungstypen sind hier dadurch charakterisiert, daß Individuen, die den gleichen Paarungstyp besitzen, in die sie umgebende Kulturflüssigkeit die gleichen spezifischen Stoffe abgeben. Bei *Euplotes patella* werden durch diese Stoffe Individuen anderer Paarungstypen zur Selbstung veranlaßt, während bei *Euplotes eurystomus* die abgegebenen Stoffe bei dem anderen Paarungstyp gerade umgekehrt die Selbstung unterdrücken.

Für *Euplotes vannus* konnten fünf verschiedene Paarungstypen isoliert werden. Vereinigt man Individuen von Klonen zweier verschiedener Paarungstypen, so führt dies in jeder beliebigen Kombination nach einiger Zeit zur Paarbildung (Tabelle 1). Achtet man darauf, daß man von beiden Typen etwa gleichviele Tiere vereinigt und sich zu diesem Zeitpunkt das Futter in den Kulturen gerade erschöpft, so beteiligen sich an der Konjugation über 95 % der Zellen.

Tabelle 1

Das Paarungssystem von *Euplotes vannus*. + bedeutet, daß Konjugation nach dem Vereinigen von Tieren dieser Paarungstypen stattfindet

Paarungstypen	I	II	III	IV	V
I	—	+	+	+	+
II		—	+	+	+
III			—	+	+
IV				—	+
V					—

Versuche, mit zellfreien Filtraten der einzelnen Paarungstypen bei den anderen Typen Selbstung auszulösen, verliefen negativ. Es konnte keinerlei Reaktion auf solche Filtrate beobachtet werden. Da auch nie intraklonale Konjugation gefunden wurde, lag die Vermutung nahe, daß bei *Euplotes vannus* nur Individuen miteinander konjugieren, die verschiedenen Paarungstypen angehören.

Um dies zu prüfen, wurden Klone miteinander vereinigt, deren Individuen sich deutlich morphologisch unterschieden. Als Markierung eignete sich hierzu gut eine in verschiedenen Klonen aufgetretene Anomalie, bei welcher das Plasma wesentlich dunkler erscheint, als dies normalerweise der Fall ist. (Die als Nahrung gebotene *Dunaliella* kann wahrscheinlich nicht mehr vollständig „verdaut" werden, so daß sich im Plasma Stoffe anreichern, die nicht weiter aufgeschlossen werden. Die Tiere sind sehr anfällig, haben eine sehr niedrige Teilungsrate und neigen zu Teilungsanomalien.) Wurden solche Individuen mit normalen Tieren eines anderen Paarungstyps vereinigt, so konjugierten immer nur dunkle mit hellen Tieren.

Recht gut ließ sich auch als Markierung die für einzelne Klone charakteristische Größe der Zellen verwenden. Abb. 5 zeigt z. B. die Konjugation zwischen Tieren des Klons 1(23)—II (mittlere Größe 110 μ) und Tieren des Klons 2(47)—III (mittlere Größe 90 μ). Traten in solchen Klongemischen Paare auf, in denen sich die beiden Partner in der Größe nicht deutlich voneinander unterschieden, so wurden diese

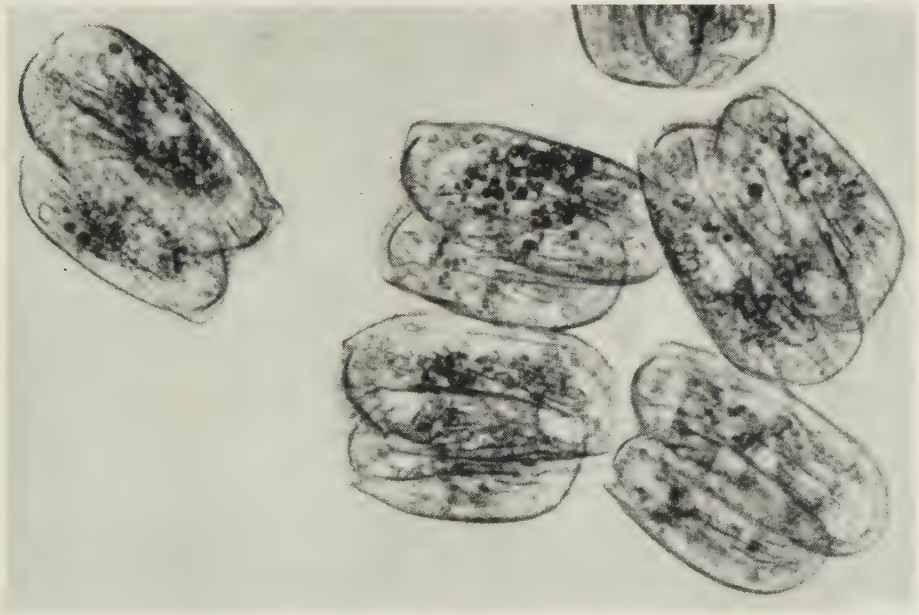


Abb. 5. Konjugation zwischen Tieren zweier Klone, deren Individuen sich in der Durchschnittsgröße unterscheiden. Lebendaufnahme, Vergr. 400×.

Paare isoliert, die Konjuganten voneinander getrennt und davon Klone angelegt („split-pair"-Methode). Stets zeigte eine spätere Prüfung, daß diese Klone verschiedenen Paarungstypen angehörten und deren Individuen sich außerdem deutlich in der Durchschnittsgröße voneinander unterschieden. In den Paaren mit gleich großen Partnern hatten also nur besonders große Tiere des einen Klons mit besonders kleinen Tieren des anderen Klons konjugiert.

Zum Unterschied von den beiden bisher untersuchten *Euplotes*-Arten (*Euplotes patella*, KIMBALL 1939; *Euplotes eurystomus*, KATASHIMA 1959) konjugieren also bei *Euplotes vannus* immer nur Individuen miteinander, die verschiedenen Paarungstypen angehören.

F. Determination und Erbgang der Paarungstypen

Auch die Bestimmung der Paarungstypen erfolgt bei den wenigen bisher daraufhin geprüften Ciliaten in unterschiedlicher Weise. Während bei *Paramecium aurelia* (SONNEBORN 1939) und *Tetrahymena pyriformis Varietät* 1 (NANNEY und CAUGHEY 1953) eine modifikatorische Determination festgestellt wurde, fand man für *Paramecium bursaria* (SIEGEL und LARISON 1960) und *Euplotes patella* (KIMBALL 1942) eine genetische Bestimmung der Paarungstypen.

Um zu klären, auf welche Weise die Bestimmung der Paarungstypen bei *Euplotes vannus* erfolgt, wurden Tiere der fünf Standardklone[1]) miteinander gekreuzt und von den Exkonjuganten Klonkulturen angelegt. Nachdem die Exkonjugantenklone herangewachsen waren und die Tiere Konjugationsbereitschaft zeigten — *Euplotes vannus* benötigt eine Reifezeit von 3—6 Monaten — wurde ihr Paarungstyp festgestellt, indem sie mit Tieren der fünf Standardklone vereinigt wurden. Führte dies in vier Klongemischen zur Konjugation, so wurde dem getesteten Klon der Paarungstyp des fünften Standardklons zugesprochen, mit dessen Tieren er keine Reaktion zeigte.

Nachdem von einer größeren Anzahl Exkonjuganten der Paarungstyp festgestellt war, ergab sich folgendes Bild: Die Klone hatten teils den Typ des einen Elters, teils den Typ des anderen Elters oder sie gehörten einem weiteren Paarungstyp an. Verglich man die Klone miteinander, die aus den beiden ehemaligen Konjugationspartnern hervorgegangen waren, so zeigte sich, daß beide den gleichen Paarungstyp besitzen konnten, sich aber auch recht häufig im Paarungstyp voneinander unterschieden. Dies führte zunächst zu der Vermutung, daß die Determination der Paarungstypen bei *Euplotes vannus* modifikatorisch sei. Weitere Ergebnisse zeigten aber, daß bei einer Kreuzung zwischen zwei Standardklonen nie alle fünf, sondern höchstens drei Paarungstypen unter den Nachkommen auftraten und für jede Kreuzung bestimmte Kombinationen von Paarungstypen charakteristisch waren (Tabelle 2). Dies konnte aber nur in einer genotypischen Determination der

1) Als Standardklone werden die ursprünglichen Repräsentanten der fünf verschiedenen Paarungstypen bezeichnet.

Paarungstypen seine Erklärung finden. Daß die Klone aus ehemaligen Konjugationspartnern nicht stets vom gleichen Typ sind, würde dann allerdings bedeuten, daß die von einem Konjuganten gebildeten Vorkerne bei *Euplotes vannus* genetisch verschieden sein können.

Tabelle 2

Die Verteilung der Nachkommen auf die einzelnen Paarungstypen bei Kreuzungen zwischen den fünf Standardklonen. Die in Klammer gesetzten Werte stellen Ausnahmen dar; sie lassen sich durch Cytogamie erklären

Kreuzung der Standardklone		Paarungstypen der F_1-Klone				
Bezeichnung der Klone	Paarungstyp der gekreuzten Klone	I	II	III	IV	V
a × e	V × I		11			9
b × e	IV × I		11		11	
c × e	III × I	(1)	33	35		
d × e	II × I	26	17			
a × d	V × II		67			72
b × d	IV × II		21		18	
c × d	III × II	(4)	38	37		
a × c	V × III		4	7		8
b × c	IV × III		4	1	5	
a × b	V × IV		12		15	29

Die in Tabelle 2 zusammengestellten Kreuzungsergebnisse lassen sich nun einfach erklären, wenn man folgende Annahmen macht:

1. Für die Determination der fünf Paarungstypen ist ein Gen verantwortlich, von dem fünf verschiedene Allele existieren.
2. Zwischen diesen Allelen herrscht vollständige Dominanz.
3. Die fünf Allele lassen sich auf Grund ihrer gegenseitigen Dominanzbeziehungen seriieren.

Bezeichnet man nun das gegenüber allen anderen Allelen sich rezessiv verhaltende Gen mit mt^1 und den dadurch determinierten Phänotyp als Paarungstyp I, das über mt^1 dominante aber gegenüber allen anderen Allelen rezessive Gen mit mt^2 und den dadurch zur Ausbildung gebrachten Paarungstyp als Typ II, das in der Serie folgende Allel mit mt^3, das nächste mit mt^4 und schließlich das letzte, über alle anderen dominante Allel mit mt^5 und entsprechend die dazu gehörenden Paarungstypen als Typ III, Typ IV und Typ V, so lassen sich die Beziehungen zwischen den Allelen jederzeit direkt aus ihrer Benennung ablesen. Bei dieser Bezeichnungsweise ist dann stets das Allel mit höherem Index dominant über alle Allele mit niedererem Index.

Für die fünf Standardklone (Tabelle 2), von denen jeder einem anderen Paarungstyp angehört, kann dann der Genotyp wie folgt angegeben werden: a = mt^5mt^2, b = mt^4mt^2, c = mt^3mt^2, d = mt^2mt^1 und e = mt^1mt^1.

Sind diese Formulierungen richtig, so müssen neben den für die Standardklone ermittelten Genotypen noch andere Allelenkombinationen möglich sein. So sollten z. B. die bei der Kreuzung a—V (mt^5mt^2)×b - IV (mt^4mt^2) aufgetretenen Exkonjuganten vom Typ II nicht den Genotyp mt^2mt^1 wie Klon d, sondern den neuen Genotyp mt^2mt^2 besitzen. Auch sollten unter den Exkonjuganten vom Typ V dieser Kreuzung neben solchen mit dem Genotyp mt^5mt^2 auch solche mit dem Genotyp mt^5mt^4 vorkommen. Durch Kreuzen der F_1-Tiere mit solchen vom Typ I (mt^1mt^1) sollten sich diese Annahmen leicht prüfen lassen.

Ähnliche Überlegungen gelten auch für die anderen Kreuzungen. Es fragt sich daher, ob nicht alle 15 verschiedenen Kombinationsmöglichkeiten der fünf den Paarungstyp bestimmenden Allele existieren können. Sie sind in Tabelle 3 nach ihren Phänotypen geordnet zusammengestellt.

Tabelle 3

Paarungstyp	Genotypen				
I	mt^1mt^1				
II	mt^2mt^2,	mt^2mt^1			
III	mt^3mt^3,	mt^3mt^2,	mt^3mt^1		
IV	mt^4mt^4,	mt^4mt^3,	mt^4mt^2,	mt^4mt^1	
V	mt^5mt^5,	mt^5mt^4,	mt^5mt^3,	mt^5mt^1,	mt^1mt^4

Um die aus der Hypothese abgeleiteten Forderungen zu prüfen, wurden zunächst F_1-Klone der Kreuzung a—V×b—IV mit Tieren vom Typ I (mt^1mt^1) gekreuzt. Dadurch konnten für die Exkonjugantenklone vom Typ V die beiden geforderten Genotypen mt^5mt^4 und mt^5mt^2 sowie für die Tiere vom Typ II der Genotyp mt^2mt^2 nachgewiesen werden (Tabelle 4).

Tabelle 4

Daten zum Erbgang der Paarungstyp-Allele. Die in Klammer gesetzten Werte stellen Ausnahmen dar; sie lassen sich durch Cytogamie erklären

Kreuzung der Elternklone	Testkreuzung	Paarungstypen der Nachkommen der Testkreuzung					Genotyp des F_1-Klons
	F_1-Klon × Testklon	I	II	III	IV	V	
a—V×b—IV	1(10)—V × mt^1mt^1				13	11	mt^5mt^4
mt^5mt^2 mt^4mt^2	1(24)—V × mt^1mt^1	(2)	66			68	mt^5mt^2
	1(21)—IV × mt^1mt^1	(1)	18		14		mt^4mt^2
	1(66)—IV × mt^3mt^1	(2)	31	39	72		mt^4mt^2
	1(23)—II × mt^1mt^1	(1)	110				mt^2mt^2

Die in Tabelle 4 aufgeführten Klone 1(10)—V[1]), 1(24)—V und 1(66)—IV wurden für weitere Kreuzungen herangezogen. Unter den Nachkommen von

$$1(10)\text{—V}\ (mt^5mt^4)\times 1(66)\text{—IV}\ (mt^4mt^2)$$

konnten solche mit dem Genotyp mt^4mt^4 gefunden werden (Tabelle 5). Der aus der Kreuzung c—III×d—II stammende Klon 2(47)—III (mt^3mt^1) wurde mit 1(24)—V (mt^5mt^2) gekreuzt und lieferte unter den Nachkommen solche mit dem Genotyp mt^5mt^1 und solche mit dem Genotyp mt^5mt^3 (Tabelle 6). Die Kreuzung

$$1(66)\text{—IV}\ (mt^4mt^2)\times 2(47)\text{—III}\ (mt^3mt^1)$$

führte zu den Genotypen mt^4mt^1 und mt^1mt^3 (Tabelle 7). Bei der Kreuzung

$$4(40)\text{—V}\ (mt^5mt^3)\times 5(122)\text{—IV}\ (mt^4mt^3)$$

hatten schließlich die Exkonjugantenklone vom Typ III wie erwartet den Genotyp mt^3mt^3 (Tabelle 8).

Tabelle 5

Daten zum Erbgang der Paarungstyp-Allele. Die in Klammer gesetzten Werte stellen Ausnahmen dar; sie lassen sich durch Cytogamie erklären

Kreuzung der Elternklone	Testkreuzung F_1-Klon × Testklon	Paarungstypen der Nachkommen der Testkreuzung I	II	III	IV	V	Genotyp des F_1-Klons
1(10)—V×1(66)—IV	3(37)—IV × mt^1mt^1	(1)	29		29		mt^4mt^2
mt^5mt^4 mt^4mt^2	3(40)—IV × mt^1mt^1	(1)			32		mt^4mt^4
	3(95) -IV × mt^1mt^1				53		mt^4mt^4
	3(5)—V × mt^1mt^1				17	10	mt^5mt^4
	3(56)—V × mt^1mt^1		12			13	mt^5mt^2

Tabelle 6

Daten zum Erbgang der Paarungstyp-Allele. Die in Klammer gesetzten Werte stellen Ausnahmen dar; sie lassen sich durch Cytogamie erklären

Kreuzung der Elternklone	Testkreuzung F_1-Klon × Testklon	Paarungstypen der Nachkommen der Testkreuzung I	II	III	IV	V	Genotyp des F_1-Klons
1(24)—V×2(47)—III	4(11)—V × mt^1mt^1	8				7	mt^5mt^1
mt^5mt^2 mt^3mt^1	4(23)— V × mt^1mt^1	30				19	mt^5mt^1
	4(30) -V × mt^1mt^1	14				16	mt^5mt^1
	4(60)—V × mt^1mt^1	16				6	mt^5mt^1
	4(64)—V × mt^1mt^1	9				11	mt^5mt^1
	4(114)—V × mt^1mt^1	4				14	mt^5mt^1
	4(40) V × mt^1mt^1	(1)		16		17	mt^5mt^3
	4(79)—V × mt^1mt^1	(1)		27		29	mt^5mt^3
	4(123) —V × mt^1mt^1			17		7	mt^5mt^3

1) Die arabischen Ziffern bezeichnen den Klon und die Kreuzung, aus der er stammt, die römische Zahl gibt seinen Paarungstyp an.

Tabelle 7

Daten zum Erbgang der Paarungstyp-Allele

Kreuzung der Elternklone	Testkreuzung F_1-Klon × Testklon	Paarungstypen der Nachkommen der Testkreuzung I	II	III	IV	V	Genotyp des F_1-Klons
1(66)—IV × 2(47)—III	5(126)—IV × mt^1mt^1	14			14		mt^4mt^1
mt^4mt^2 mt^3mt^1	5(138)—IV × mt^1mt^1	8			13		mt^4mt^1
	5(122)—IV × mt^1mt^1			14	24		mt^4mt^3
	5(180)—IV × mt^1mt^1			18	14		mt^4mt^3
	5(182)—IV × mt^1mt^1			17	14		mt^4mt^3

Tabelle 8

Daten zum Erbgang der Paarungstyp-Allele. Die in Klammer gesetzten Werte stellen Ausnahmen dar; sie lassen sich durch Cytogamie erklären

Kreuzung der Elternklone	Testkreuzung F_1-Klon × Testklon	Paarungstypen der Nachkommen der Testkreuzung I	II	III	IV	V	Genotyp des F_1-Klons
4(40)—V × 5(122)—IV	6(45)—III × mt^1mt^1			15			mt^3mt^3
mt^5mt^3 mt^4mt^3	6(123)—III × mt^1mt^1			23			mt^3mt^3
	6(136)—III × mt^1mt^1	(1)		21			mt^3mt^3

Bis auf den durch Kreuzung nicht erreichbaren Genotyp mt^5mt^5 konnten somit alle 14 anderen Kombinationen zwischen den fünf Allelen hergestellt und nachgewiesen werden. Damit kann aber die oben aufgestellte Hypothese als bewiesen gelten. Es ist damit ferner gezeigt, daß zwischen allen fünf Paarungstypen ein Genaustausch möglich ist und somit die fünf Paarungstypen dem gleichen Syngen (SONNEBORN 1957) angehören.

Nun wäre denkbar gewesen, daß es nach dem Vereinigen von bestimmten Paarungstypen zwar zu einer Paarbildung kommt, die Partner dann aber keine Gametenkerne austauschen können und deshalb eine Cytogamie durchlaufen. Dies wäre genetisch gesehen eine Parallele zu den von SONNEBORN (1947) für *Euplotes patella* vermuteten Verhältnissen gewesen, wo es wahrscheinlich nicht bei allen Kombinationen zwischen den sechs Paarungstypen zu einer kreuzweisen Reaktion kommt, sondern in einigen Kombinationen nur Selbstung, d. h. Konjugation zwischen Individuen des gleichen Typs stattfindet. Die oben geschilderten Kreuzungen zeigen aber eindeutig, daß es bei *Euplotes vannus* in allen Kombinationen zwischen den fünf Paarungstypen zu einer wechselseitigen Befruchtung kommt.

Tabelle 9

Daten zum Erbgang der Paarungstyp-Allele bei Kreuzungen mit großem Umfang

Kreuzung	Genotypen der gekreuzten Klone	Paarungstypen der F_1-Klone beobachtet					erwartet					P
		I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	V	
a—V × b—IV	$mt^5mt^2 \times mt^4mt^2$		12		15	29		14		14	28	0,8—0,9
1(10)—V ×1(66)— IV	$mt^5mt^4 \times mt^4mt^2$				39	38				38,5	38,5	0,9—0,95
1(24)— V ×2(47)—III	$mt^5mt^2 \times mt^3mt^1$		32	24		46		25,5	25,5		51	0,3—0,5
1(66)— IV ×2(47)— III	$mt^4mt^2 \times mt^3mt^1$		31	39	72			35,5	35,5	71		0,5—0,7
4(40)— V ×5(122)- IV	$mt^5mt^3 \times mt^4mt^3$			26	22	40			22	22	44	0,5—0,7
1(24)—V ×2(48)—I	$mt^5mt^2 \times mt^1mt^1$		66			68		67			67	0,8—0,9
2(47)— III × e- I	$mt^3mt^1 \times mt^1mt^1$	61		70			65,5		65,5			0,3—0,5
c— III × d—II	$mt^3mt^2 \times mt^2mt^1$		38	37				37,5	37,5			0,9- 0,95
c— III × e— I	$mt^3mt^2 \times mt^1mt^1$		33	35				34	34			0,8— 0,9

Soweit die Kreuzungen umfangreich genug sind, zeigen sie eine recht gute Übereinstimmung mit den erwarteten Spaltzahlen (Tabelle 9). Daraus kann aber geschlossen werden, daß die 14 Genotypen alle etwa gleich vital sind. Die immer wieder beobachtete hohe Letalität der Exkonjuganten, die in manchen Kreuzungen über 50 % betrug, kann also nicht auf bestimmte Kombinationen der für die Determination der Paarungstypen verantwortlichen Allele zurückgeführt werden. Es ist bisher nicht gelungen, dafür einzelne genetische Faktoren verantwortlich zu machen.

Bei einigen der in Tabelle 2, 4, 5, 6 und 8 aufgeführten Kreuzungen sind unter den Nachkommen Paarungstypen aufgetreten, die nicht erwartet waren. Sie sind daher in Klammer gesetzt. Diese Ausnahmen lassen sich alle leicht erklären, wenn man annimmt, daß es bei *Euplotes vannus* in seltenen Fällen nicht zu einem Austausch der Wanderkerne kommt, sondern Stationär- und Wanderkern des gleichen Individuums miteinander verschmelzen, also Cytogamie stattfindet. Nie ist ein Paarungstyp aufgetreten, dessen Entstehung sich auf diese Weise nicht zwanglos erklären ließe.

Da bei *Euplotes vannus* immer nur Individuen von verschiedenem Paarungstyp miteinander konjugieren, war es nicht möglich, den Genotyp mt^5mt^5 durch Kreuzungen herzustellen. Dies bedeutet jedoch keineswegs, daß diese Allelenkombination nicht ebenfalls möglich ist. Da, wie oben gezeigt, Cytogamie bei *Euplotes vannus* vorzukommen scheint, kann vielmehr erwartet werden, daß dadurch auch der Genotyp mt^5mt^5 in seltenen Fällen gebildet wird.

Während bei über 40 Kreuzungen der Paarungstyp der Exkonjugantenklone im allgemeinen erst nach 3—6 Monaten festgestellt werden konnte — die Reifezeit hier also recht lang war —, benötigten die Nachkommen von vier Kreuzungen eine wesentlich kürzere Reifezeit. Obwohl hier die äußeren Bedingungen bei der Aufzucht nicht geändert worden waren, konnte bei den Nachkommen dieser vier Kreuzungen der Paarungstyp bereits nach einem Monat ermittelt werden. Da allen vier Kreuzungen der eine Elternklon gemeinsam ist und die vier anderen Elternklone besonders früh reif gewordene Klone aus Kreuzungen mit der normalen durchschnittlichen Reifezeit von 3—6 Monaten sind, liegt die Vermutung nahe, daß auch die Dauer der Reifezeit bei *Euplotes vannus* von einzelnen genetischen Faktoren gesteuert wird. Eine genaue Analyse dieser Verhältnisse steht jedoch noch aus.

G. Genetische Analyse postmeiotischer Vorgänge

Bei den meisten Ciliaten wird die postmeiotische Teilung nur von einem Gonenkern durchgeführt. Die beiden Vorkerne eines Konjuganten unterscheiden sich daher genetisch nicht voneinander. Da bei der Konjugation jeweils einer dieser Kerne in den anderen Partner hinüberwechselt und dort mit dessen stationärem Gametenkern verschmilzt, kommt es in den beiden Konjuganten zur Ausbildung von genetisch

identischen Synkaryen. Aus diesen bildet sich dann der neue Kernapparat, während der alte Makronucleus im Plasma abgebaut wird. Die bei der Konjugation ablaufenden Vorgänge führen also zu zwei Exkonjuganten, die in allen durch Kerngene determinierten Eigenschaften übereinstimmen.

Wie schon auf S. 401 ausgeführt, wird bei den *Euplotes*-Arten die postmeiotische Teilung von zwei Gonenkernen durchgeführt. Da von den vier Teilungsprodukten nur zwei zu Gametenkernen werden — die beiden anderen werden pyknotisch und gehen zugrunde —, fragt es sich, ob die beiden Vorkerne hier auch Geschwisterkerne sind, oder ob sie sich von verschiedenen Gonenkernen herleiten.

Durch cytologische Untersuchungen ließ sich diese Frage bei *Euplotes vannus* nicht entscheiden. Da aber die Determination der Paarungstypen hier auf genetischem Weg erfolgt, läßt sich diese Frage prüfen, indem man beide Konjugationspartner aufzieht und den Paarungstyp dieser Synklone vergleicht. Von insgesamt 648 geprüften Klonpaaren zeigten 421 Paare bei beiden Synklonen den gleichen Paarungstyp, während bei 227 Paaren die Synklone verschiedenen Paarungstypen angehörten. Daraus ergibt sich aber, daß sich bei *Euplotes vannus* die beiden Gametenkerne von verschiedenen Gonenkernen herleiten können.

Es stellt sich dann jedoch die Frage: Stammen die beiden Vorkerne stets von verschiedenen Gonenkernen ab, liefert also immer der eine Gonenkern den Wanderkern und der andere den Stationärkern oder können die beiden Gametenkerne auch Geschwisterkerne sein?

Für den Fall, daß sich die Vorkerne stets von verschiedenen Gonenkernen herleiten, muß man erwarten, daß für eine Kreuzung vom Typ $mt^4mt^3 \times mt^2mt^1$ die Zahl der Klonpaare, bei denen beide Synklone den gleichen Phänotyp haben, gleich der Zahl der Klonpaare ist, bei denen sich die Synklone im Paarungstyp voneinander unterscheiden (s. Tabelle 10). Dabei wird vorausgesetzt, daß die einzelnen Kombinationen der Gametenkerne gleich häufig sind, zwischen den beiden überlebenden Gonenkernen, von denen sie sich ableiten, also keinerlei Korrelation vorliegt, sondern diese rein zufällig den gleichen oder verschiedenen Genotyp besitzen.

Ein solches 1 : 1-Verhältnis ist nicht nur für die Kreuzung $mt^4mt^3 \times mt^2mt^1$ zu erwarten, sondern für alle Kreuzungen, bei denen die beiden Allele mit dem höchsten Index in einem Partner vorliegen, es auf Grund der Dominanzverhältnisse unter den Nachkommen also auch nur zu einer Aufspaltung in zwei verschiedene Phänotypen kommt. Es können daher auch Kreuzungen vom Typ $mt^4mt^3 \times mt^1mt^1$ zur Beurteilung herangezogen werden, nicht aber solche vom Typ $mt^4mt^1 \times mt^3mt^2$.

Um nun die oben aufgeworfene Frage zu prüfen, wurden aus allen Kreuzungen, bei denen unter den gemachten Voraussetzungen dieses 1 : 1-Verhältnis zu erwarten war, die Klonpaare zusammengestellt. Dabei ergab sich, daß von insgesamt 530 Klonpaaren 356 Paare bei beiden Synklonen den gleichen Paarungstyp zeigten, während bei 174 Klonpaaren sich die Synklone im Paarungstyp voneinander unterschieden.

Tabelle 10

Kombinationsquadrat für die Kreuzung $mt^4mt^3 \times mt^2mt^1$. An den Seiten sind die verschiedenen Kombinationsmöglichkeiten der Vorkerne der Konjuganten angeordnet. In den Feldern sind die nach Austausch der Wanderkerne sich ergebenden Genotypen der beiden Synklone aufgeführt.

Kombinationsmöglichkeiten der Vorkerne	(mt^2)	(mt^2)	(mt^2)	(mt^1)	(mt^1)	(mt^2)	(mt^1)	(mt^1)	
(mt^4)	mt^4mt^2		mt^4mt^2		mt^4mt^1		mt^4mt^1		Klonpaare mit
(mt^4)	mt^4mt^2		mt^4mt^1		mt^4mt^2		mt^4mt^1		Synklonen gleichen Phänotyps
(mt^4)	mt^4mt^2		mt^4mt^2		mt^4mt^1		mt^4mt^1		
(mt^3)	mt^3mt^2		mt^3mt^1		mt^3mt^2		mt^3mt^1		Klonpaare, deren Synklone verschiedenen Phänotyp besitzen
(mt^3)	mt^3mt^2		mt^3mt^2		mt^3mt^1		mt^3mt^1		
(mt^4)	mt^4mt^2		mt^4mt^1		mt^4mt^2		mt^4mt^1		
(mt^3)	mt^3mt^2		mt^3mt^2		mt^3mt^1		mt^3mt^1		Klonpaare mit
(mt^3)	mt^3mt^2		mt^3mt^1		mt^3mt^2		mt^3mt^1		Synklonen gleichen Phänotyps

Dieses Ergebnis weicht aber von einem 1 : 1-Verhältnis stark ab, es muß daher geschlossen werden, daß die Annahme — die Vorkerne leiten sich immer von verschiedenen Gonenkernen ab, genetische Gleichheit ist rein zufällig bedingt — nicht der Wirklichkeit entspricht, sondern die beiden Gametenkerne auch Geschwisterkerne sein können.

Bei *Euplotes vannus* sind also beide Möglichkeiten verwirklicht, die Vorkerne leiten sich teils von verschiedenen, teils vom gleichen Gonenkern her. Auf die Folgerungen, die sich daraus für den Zeitpunkt der Differenzierung in Stationär- und Wanderkern ergeben, wurde bereits auf S. 401 im cytologischen Teil der Arbeit hingewiesen.

Man kann sich natürlich nun fragen, ob nicht zwischen den beiden überlebenden Gonenkernen eine Korrelation besteht derart, daß sie häufiger genetisch identisch sind, als dies rein zufällig zu erwarten ist. Ein solcher Fall wäre z. B. gegeben, wenn die beiden überlebenden Gonenkerne Geschwisterkerne wären. Genetische Unterschiede müßte man in diesem Fall durch Postreduktion nach vorausgegangenem „crossing over" erklären und es wäre dann möglich, daß sich die Gametenkerne stets von verschiedenen Gonenkernen ableiten. Für eine solche Annahme besteht aber cytologisch keinerlei Hinweis. Wie schon auf S. 400 ausgeführt, überleben von den acht Gonenkernen normalerweise der in den Tieren am weitesten vorne und der am weitesten hinten liegende Kern und diese sollten sich jeder von einem anderen der beiden bei der prämeiotischen Teilung gebildeten diploiden Kerne herleiten, auch

in den Fällen, in denen sich in den meiotischen Teilungen Kerne aneinander vorbeischieben.

Durch Zufall konnte ich kürzlich feststellen, daß Cohen (1934) bereits vor 28 Jahren bei einer von ihm als *Euplotes patella* bezeichneten Art[1]) ebenfalls zu dem Ergebnis gekommen ist, daß sich die Vorkerne manchmal vom gleichen und manchmal von verschiedenen Gonenkernen herleiten. Er hat, bevor Paarungstypen überhaupt bekannt waren, die Vererbung der Körperform bei dieser Art untersucht und dabei gefunden, daß von 46 Paaren, von denen er beide Synklone auswerten konnte, bei 34 Paaren beide den gleichen Phänotyp hatten, während in 12 Paaren sich die Synklone voneinander unterschieden.

Interessant ist, daß sich aus den Daten von Kimball (1942) für *Euplotes patella* andere Verhältnisse ergeben. Er hat von insgesamt 69 Paaren beide Synklone aufgezogen und gefunden, daß davon in 63 Fällen beide Synklone den gleichen Paarungstyp hatten und nur bei 6 Paaren sich die Synklone voneinander unterschieden. Da bei *Euplotes patella* auch Cytogamie vorzukommen scheint, ist es möglich, daß sich die Unterschiede bei den 6 Paaren dadurch erklären lassen. Bei *Euplotes patella* wären dann die Vorkerne normalerweise Geschwisterkerne, obwohl auch hier zwei Gonenkerne die letzte progame Teilung durchführen.

H. Diskussion

Wie bei *Euplotes patella* (Kimball 1939), *Oxytricha bifaria* (Siegel 1956) und *Tetrahymena pyriformis* (Nanney und Caughey 1953) vergeht auch bei *Euplotes vannus* nach dem Vereinigen von Zellen verschiedener Paarungstypen zunächst einige Zeit, bevor eine erste, die Konjugation einleitende Reaktion beobachtet werden kann. Auch unter günstigsten Bedingungen benötigt *Euplotes vannus* ungefähr 1 Stunde, bis die Tiere ihr Verhalten ändern und allmählich in ein Paarungsspiel eintreten. Gleichzeitig kann nun auch beobachtet werden, daß Individuen, die verschiedenen Paarungstypen angehören, miteinander verkleben, wenn sie mit ihren Cirren in Kontakt gelangen. Ist die Kulturschale dicht besetzt, so kann es sogar zu einer der Agglutinationsreaktion der *Paramecien* vergleichbaren Gruppenbildung kommen. Bei *Euplotes vannus* sind die Individuen also offenbar erst, nachdem sie etwa 1 Stunde mit den Individuen eines anderen Paarungstyps vereinigt sind, auf einem mit reifen Zellen von *Paramecium aurelia* und *Paramecium bursaria* vergleichbaren Stadium.

Kimball (1939) fand nun, daß bei *Euplotes patella* von den Zellen in die Kulturflüssigkeit spezifische Stoffe abgegeben werden und daß durch diese Stoffe bei Individuen anderer Paarungstypen die für die Konjugation notwendigen Veränderungen ausgelöst werden. Da auch hier der Kontakt zwischen zwei Partnern zu-

1) Nach Pierson (1943) hat Cohen mit *Euplotes eurystomus* gearbeitet.

nächst über die Ventralcirren erfolgt, wird erwogen (KIMBALL 1943, METZ 1954), ob nicht vielleicht durch die in die Kulturflüssigkeit abgegebenen Stoffe erst die Synthese von Paarungssubstanzen induziert wird und durch diese Paarungssubstanzen dann der Kontakt zwischen den Individuen herbeigeführt wird. Diese Deutung würde erklären, warum bei *Euplotes patella* im Unterschied zu *Paramecium aurelia* und *Paramecium bursaria* unmittelbar nach dem Vereinigen typenverschiedener Zellen keine Reaktion erfolgt, sondern mindestens 90 Minuten vergehen, ehe die Tiere mit der Konjugation beginnen.

Es wurde daher auch bei *Euplotes vannus* nach in die Kulturflüssigkeit abgegebenen Stoffen gesucht. Es war jedoch nicht möglich, irgendeine Wirkung von zellfreien Filtraten eines Typs auf Zellen der anderen Paarungstypen festzustellen. Auch gelang es nicht, bei wechselseitig mit solchen Filtraten vorbehandelten Zellen die Konjugation früher auszulösen als in gleichzeitig vereinigten Kontrollen. Da also offenbar gegenseitiger Kontakt zwischen den Individuen verschiedener Paarungstypen notwendig ist, um diese in Konjugationsbereitschaft zu versetzen, könnte man vielleicht daran denken, daß hierbei wasserunlösliche Stoffe übertragen werden, welche dann die gleiche Aufgabe erfüllen, wie die von KIMBALL (1939) für *Euplotes patella* nachgewiesenen Stoffe. Eine solche Übertragung durch Kontakt würde wahrscheinlich den natürlichen Verhältnissen auch besser entsprechen als ein Abscheiden dieser Substanzen in die umgebende Flüssigkeit.

Vielleicht darf man eine solche Übertragung auch für *Euplotes patella* als den Normalfall annehmen. SONNEBORN (1957) hat darauf aufmerksam gemacht, daß man sich nur schwer vorstellen kann, daß in freier Natur durch in das Wasser abgegebene Stoffe auf Zellen anderer Paarungstypen ein Einfluß möglich ist, wenn sich nicht typenverschiedene Zellen in unmittelbarer Nähe oder sogar gegenseitigem Kontakt befinden.

Die gleiche Überlegung gilt auch für die von KATASHIMA (1959) für *Euplotes eurystomus* aufgefundenen Stoffe. Auch sie werden von den Individuen in die Kulturflüssigkeit abgeschieden, bewirken aber nicht die Selbstung bei Zellen anderer Typen, wie die von KIMBALL gefundenen Stoffe, sondern unterdrücken vielmehr die Selbstung bei Tieren des korrespondierenden anderen Paarungstyps und ermöglichen hierdurch eine Konjugation zwischen den Individuen dieser verschiedenen Typen. Auch hier darf man vermuten, daß diese Stoffe nur auf kürzeste Entfernung, wahrscheinlich sogar erst, nachdem die Tiere bereits in Kontakt sind, wirksam werden. Da KATASHIMA betont, daß Selbstung (wahrscheinlich ganz allgemein Konjugationsbereitschaft) durch andere Faktoren ausgelöst wird, scheint mir die Vermutung berechtigt, daß die von KATASHIMA gefundenen Stoffe in freier Natur erst wirksam werden, nachdem sich bereits für die Konjugation aktivierte Tiere gepaart haben. Haben sich zufällig zwei Individuen von verschiedenem Paarungstyp miteinander vereinigt, so könnten diese Stoffe nun bewirken, daß zwischen den beiden Partnern

ein Kernaustausch erfolgt, während sonst jeder Partner für sich eine Autogamie durchführt, bei Selbstung also normalerweise Cytogamie stattfindet. Für diese Vermutung spricht auch der Befund von KATASHIMA, daß in Paaren aus Individuen des gleichen Typs der Kontakt zwischen den Partnern wesentlich weniger fest ist, als in Paaren aus Tieren von verschiedenem Paarungstyp und daß, falls man Tiere des gleichen Typs während der Konjugation trennt, diese in etwa 70 % der Fälle überleben und eine Autogamie durchführen, während bei Paaren, deren Partner verschiedenen Typen angehören, nach der Trennung fast alle Tiere absterben. Eine solche Deutung würde auch den zunächst überraschenden Unterschied zwischen den Verhältnissen bei *Euplotes patella* und der nahe verwandten Art *Euplotes eurystomus* erklären. Da der von KATASHIMA aufgefundene Mechanismus bei einer solchen Deutung auf einer ganz anderen Ebene, d. h. zu einem späteren Zeitpunkt im Ablauf der Konjugation wirksam würde, als die von KIMBALL entdeckten Stoffe, dürfte man dann die für diese beiden *Euplotes*-Arten aufgefundenen Mechanismen nicht miteinander vergleichen.

Für *Euplotes vannus* sind bisher fünf verschiedene Paarungstypen bekannt. Da diese fünf Paarungstypen letztlich auf eine einzige der Natur entnommene Probe zurückgehen, kann erwartet werden, daß in freier Natur noch weitere Paarungstypen existieren. Leider war es mir bisher nicht möglich, neues Material zu sammeln.

Wie im Abschnitt „Determination und Erbgang der Paarungstypen" gezeigt, erfolgt bei *Euplotes vannus* die Bestimmung der Paarungstypen auf genetischem Weg, also genauso wie bei *Euplotes patella* (KIMBALL 1942). In beiden Fällen können für die Determination die Allele eines einzigen Genlocus verantwortlich gemacht werden. Während aber bei *Euplotes patella* die drei dort gefundenen Allele sich unabhängig voneinander manifestieren, also codominant sind, herrscht zwischen den fünf für *Euplotes vannus* gefundenen Allelen vollständige Dominanz. Dies hat zur Folge, daß bei *Euplotes vannus* Tiere des gleichen Paarungstyps verschiedenen Genotyp besitzen können, während bei *Euplotes patella* jedem Genotyp ein anderer Paarungstyp entspricht.

Bei *Euplotes patella* konnte KIMBALL (1942) eine direkte Beziehung zwischen den drei von ihm gefundenen Allelen und den drei in der Kulturflüssigkeit nachweisbaren Stoffen aufzeigen. Jedes Allel steuert die Ausbildung eines anderen Stoffes. Ob auch bei *Euplotes vannus* den fünf für die Determination der Paarungstypen verantwortlichen Allelen fünf verschiedene, vielleicht durch Kontakt übertragbare, Stoffe entsprechen und diese dann auch die Funktion haben, Tiere eines anderen Paarungstyps in Konjugationsbereitschaft zu versetzen, kann bisher nur vermutet werden. Da bei *Euplotes patella* und *Euplotes vannus* aber nach dem Vereinigen typenverschiedener Individuen mindestens 1 Stunde vergeht, bevor die Tiere in die Konjugation eintreten, kann als Arbeitshypothese angenommen werden, daß in beiden Fällen ein prinzipiell ähnlicher Mechanismus vorliegt.

Nun haben in großem Umfang durchgeführte Kreuzungsexperimente in den letzten Jahren den Verdacht erbracht, daß es sich bei allen Fällen multipler Allelie in Wahrheit um Pseudoallelie handelt (Zusammenfassung: CARLSON 1959). Man müßte in diesem Fall den *mt*-Locus von *Euplotes patella* und *Euplotes vannus* als Komplexlocus auffassen, wie dies GRELL (1956) auch für *Paramecium aurelia* und *Tetrahymena pyriformis Varietät 1* aus anderen Gründen vorschlägt[1]). Da für *Euplotes vannus* keine Beobachtungen vorliegen, die eine solche Vorstellung nahelegen, wurde die einfachere Schreibweise gewählt und die für die Determination der Paarungstypen verantwortlichen Faktoren als Allele bezeichnet.

Es ist schon lange bekannt (BALBIANI 1860, BÜTSCHLI 1876, MAUPAS 1888, 1889), daß die Ciliaten nach einer gewissen Zeit der ungeschlechtlichen Vermehrung eine geschlechtliche Fortpflanzung durchführen müssen und somit eine Art Lebenszyklus durchlaufen. Diese Beobachtung hat durch die Entdeckung der Paarungstypen und die sich daran anschließenden Arbeiten eine wesentliche Vertiefung erfahren, so daß für alle bisher näher untersuchten Ciliaten sich heute folgendes Bild ergibt: Die Abkömmlinge eines Exkonjuganten können sich im allgemeinen zunächst nur vegetativ vermehren. Sie sind zu einer geschlechtlichen Fortpflanzung nicht befähigt. Man bezeichnet sie daher als „unreif" und diesen Abschnitt im „Leben eines Klons" als seine „Reifezeit". Daran schließt sich ein Abschnitt, indem die Tiere eines Klons als „reif" bezeichnet werden. Nun zeigen die Individuen dieses Klons Konjugationsbereitschaft und es kann ihr Paarungstyp eindeutig festgestellt werden. Untersuchungen vor allem von JENNINGS (1944) und SONNEBORN (1954) haben die alte Anschauung erhärtet, daß Ciliaten, die in dieser Zeit nicht konjugieren, in ein Stadium der „Senilität" eintreten. Manche Formen können nun eine Autogamie durchführen und damit einen neuen Zyklus beginnen, andere Arten sind dazu aber nicht in der Lage. Bei ihnen sinkt nach und nach die Teilungsrate ab, es können Anomalien auftreten und die Mikronuclei verlorengehen. Solche „alten" Klone sterben schließlich ab.

Dieser in seinen Grundzügen offenbar allen Ciliaten gemeinsame Lebenszyklus ist bei den verschiedenen Arten in den einzelnen Phasen modifiziert, in enger Beziehung zu dem jeweiligen Paarungssystem (SONNEBORN 1957): „Outbreeder", d. h. Formen, deren Paarungssystem auf Fremdbefruchtung angelegt ist, zeigen eine lange Reifezeit und sind danach oft über Jahre hinaus in der Lage zu konjugieren. Der gesamte Lebenszyklus ist bei ihnen in die Länge gedehnt. Sie besitzen ein multiples Paarungssystem, meist gekoppelt mit einer genotypischen Determination der Paarungstypen. Autogamie tritt bei ihnen nicht auf. „Inbreeder" zeichnen sich durch einen kurzen Lebenszyklus aus. Sie besitzen meist nur zwei Paarungstypen, deren

1) Die für *Paramecium aurelia* und *Tetrahymena pyriformis Varietät 1* nachgewiesene modifikatorische Determination der Paarungstypen ließe sich dann als alternative Aktivierung einzelner Paarungstypgene verstehen.

Determination modifikatorisch erfolgt. Gelangen sie nicht innerhalb der kurzen Zeit der Reife zur Konjugation, so kann ein neuer Lebenszyklus durch eine Autogamie begonnen werden. Zwischen diesen beiden Extremen gibt es Übergänge.

Versucht man *Euplotes vannus* auf Grund der bisher verfügbaren Daten einzuordnen, so kommt man zu dem Ergebnis, daß es sich hierbei um einen extremen „outbreeder" handelt. Neben einem multiplen Paarungssystem und einer genetischen Determination der Paarungstypen besitzt *Euplotes vannus* eine relativ lange Reifezeit. Sie beträgt bei guter Fütterung 3—6 Monate. Außerdem zeigen Klone, die seit 3 Jahren gehalten werden, von wenigen Ausnahmen abgesehen, bisher noch keine Anzeichen der „Senilität". Von den aus Rohkulturen isolierten Standardklonen ist erst einer abgestorben. Sein genaues Alter ist nicht bekannt. Dieser Klon war vorher gegen Umweltseinflüsse, vor allem gegen zuviel Futter, sehr empfindlich, seine Teilungsrate sank immer mehr ab und schließlich traten Teilungsanomalien auf. Vereinigte man Tiere dieses Klons mit solchen eines anderen Paarungstyps, so konnte erst meist nach 24 Stunden eine schwache Reaktion beobachtet werden. Eine cytologische Prüfung ergab, daß die Tiere nicht mikronucleuslos waren. Auch bei „alten" Klonen konnte bisher nie Autogamie oder Selbstung beobachtet werden.

Zusammenfassung

1. Für den marinen hypotrichen Ciliaten *Euplotes vannus* O. F. Müller wurden fünf verschiedene Paarungstypen isoliert, die alle dem gleichen Syngen angehören.

2. Vereinigt man reife Zellen dieser Paarungstypen, so kommt es unabhängig von Außenbedingungen nach einiger Zeit zur Konjugation.

3. Der Konjugation gehen Veränderungen an den Ventralcirren und ein Paarungsspiel voraus. In dicht besetzten Kulturen kann eine der Agglutinationsreaktion der *Paramecien* vergleichbare Gruppenbildung beobachtet werden.

4. Versuche, bei welchen der eine Paarungstyp markiert oder die Konjuganten nach der Paarbildung voneinander getrennt wurden („split-pair"-Methode), ergaben, daß nur Individuen miteinander konjugieren, die verschiedenen Paarungstypen angehören. Intraklonale Konjugation oder Autogamie wurden niemals beobachtet.

5. Es gelang nicht, durch zellfreie Filtrate der einzelnen Paarungstypen bei den Zellen anderer Typen eine Reaktion auszulösen. Es wird vermutet, daß wasserunlösliche Stoffe durch Kontakt übertragen werden und diese die der Konjugation vorausgehenden Veränderungen auslösen.

6. Umfangreiche Kreuzungen ergaben, daß die Bestimmung der Paarungstypen genetisch erfolgt. Es konnten fünf Allele eines Genlocus nachgewiesen werden, von denen jedes für die Ausbildung eines anderen Paarungstyps verantwortlich ist.

7. Die fünf Allele lassen sich auf Grund ihrer gegenseitigen Beziehungen seriieren: zwischen den Allelen herrscht vollständige Dominanz. Es gilt daher die Beziehung:

$$mt^5 > mt^4 > mt^3 > mt^2 > mt^1$$

d. h. es ist stets das Allel mit dem höheren Index dominant über alle Allele mit niedererem Index.

8. Aus der Kombination von je zwei dieser Allele ergeben sich 15 verschiedene Genotypen. Bis auf den durch Kreuzung nicht erreichbaren Genotyp mt^5mt^5 konnten alle Allelenkombinationen hergestellt und nachgewiesen werden. Sie sind alle gleich vital.

9. Aus den Kreuzungsergebnissen folgt, daß bei *Euplotes vannus* eine wechselseitige Befruchtung bei allen Kombinationen zwischen den fünf Paarungstypen stattfindet. In seltenen Fällen scheint Cytogamie vorzukommen.

10. Trotz genetischer Determination der Paarungstypen unterscheiden sich die beiden aus Konjugationspartnern angelegten Exkonjugantenklone häufig im Paarungstyp voneinander. Da die postmeiotische Teilung von zwei Gonenkernen durchgeführt wird, muß daraus geschlossen werden, daß sich die beiden Vorkerne eines Konjuganten von verschiedenen Gonenkernen herleiten können.

11. Da die Gametenkerne eines Konjuganten auch Geschwisterkerne sein können, sich die Vorkerne also teils vom gleichen, teils von verschiedenen Gonenkernen herleiten, kann angenommen werden, daß die Differenzierung in Stationär- und Wanderkern bei *Euplotes vannus* nicht an eine differentielle Kernteilung gebunden ist, sondern erst nach der postmeiotischen Teilung erfolgt.

12. *Euplotes vannus* ist nach der Terminologie von SONNEBORN (1957) als extremer „outbreeder" zu bezeichnen. Neben dem multiplen Paarungssystem und der genotypischen Determination der Paarungstypen ergibt sich dies aus der langen Reifezeit (durchschnittlich 3—6 Monate), der langen sich daran anschließenden Zeit der Konjugationsbereitschaft (über 3 Jahre) sowie dem Fehlen von Autogamie und Selbstung.

Summary

1. Five different mating types, all belonging to the same syngen, have been isolated from a population of the marine ciliate, *Euplotes vannus* O. F. MÜLLER.

2. Conjugation is observed only after mature cells of different mating types are mixed. It takes place when the food supply becomes exhausted; it does not depend on other conditions.

3. Before conjugation the ventral cirri become altered and a "pairing game" takes place. In dense cultures, an agglutination reaction, similar to that found in *Paramecium*, can be observed.

4. Investigations carried out both by the marking of one mating type and by the separation of conjugants ("split pair" method) have demonstrated that only

individuals of different mating type can conjugate with each other. Neither intraclonal conjugation nor autogamy have ever been observed.

5. Cell-free filtrates from cultures of one mating type failed to elicit any reaction in cells of another mating type. It may be presumed that water-insoluble substances are transferred by contact and that these trigger the changes which precede conjugation.

6. The results of numerous crosses have shown that the mating types are genetically determined. Five alleles have been demonstrated at a single genetic locus; each of these alleles is responsible for the development of a different mating type.

7. The five alleles can be seriated on the basis of their mutual relationships: complete dominance prevails among all of them. Therefore the following relation obtains:

$$mt^5 > mt^4 > mt^3 > mt^2 > mt^1$$

i. e. the allele with the higher index is always dominant over the allele with the lower index.

8. The different combinations of two of these alleles yield 15 different genotypes. Except for the genotype mt^5mt^5, which cannot be obtained by means of crosses, all of the allele-combinations have been produced and identified. They are all equally viable.

9. The results of the crosses demonstrate that in *Euplotes rannus* cross-fertilization takes place in all combinations of the five mating types. Only rarely does cytogamy appear to occur.

10. In spite of the genetic determination of mating type, the two exconjugant clones frequently differ in mating type. As the post-meiotic division is carried out by two of the products of meiosis, it must be concluded that the two pronuclei of one conjugant can derive from different products of meiosis.

11. Since the gamete nuclei of a conjugant may also be sister nuclei, the two pronuclei may thus be derived either from the same or from different products of meiosis. It is therefore reasonable to assume that in *Euplotes rannus* the differentiation into stationary and migratory nuclei is not determined by a differential nuclear division, but instead takes place after the post-meiotic division.

12. Following the terminology of Sonneborn (1957), *Euplotes rannus* has to be designated as an extreme outbreeder. This characterization is supported by the multiple mating type system, the genetic determination of mating type, and also by the long immaturity period (on the average 3 to 6 months), the long period of sexual maturity which follows (over 3 years), and the absence of autogamy and selfing.

Literatur

BALBIANI, G. (1860), Observations et expériences sur les phénomènes de la reproduction fissipare chez les infusoires ciliés. C. R. Acad. Sci., Paris **50**, 1191—1195.

BEALE, G. H. (1954), The Genetics of *Paramecium aurelia*. Cambridge University Press. Cambridge, England.

BÜTSCHLI, O. (1876), Studien über die ersten Entwicklungsvorgänge der Eizelle, die Zellteilung und die Conjugation der Infusorien. Abh. Senckenberg. naturforsch. Ges., Frankfurt **10**, 1—250.

CARLSON, E. A. (1959), Comparative Genetics of Complex Loci. Quarterly Rev. Biol. **34**, 33—57.

CHEN, T. T. (1946), Varieties and mating types in *Paramecium bursaria* I. New variety and types, from England, Ireland, and Czechoslovakia. Proc. nat. Acad. Sci. Wash. **32**, 173—181.

COHEN, B. M. (1934), On the inheritance of body form and of certain other characteristics in the conjugation of *Euplotes patella*. Genetics **19**, 40—61.

GRELL, K. G. (1951), Die Paarungsreaktion von *Stylonychia mytilus* MÜLLER. Z. Naturforsch. **6** b, 45—47.

— (1956), Protozoologie. Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg.

HECKMANN, K. (1961), Paarungstypen und ihre genetische Determination bei dem marinen Ciliaten *Euplotes vannus* O. F. MÜLLER. Naturw. **48**, 438.

JENNINGS, H. S. (1938), Sex reaction types and their interrelations in *Paramecium bursaria* I and II. Proc. nat. Acad. Sci. US. **24**, 112—120.

— (1939a), *Paramecium bursaria*: mating types and groups, mating behavior, selfsterility: their development and inheritance. Amer. Naturalist **73**, 414—431.

— (1939b), Genetics of *Paramecium bursaria*. I. Mating types and groups, their interrelations and distribution: mating behavior and selfsterility. Genetics **24**, 202—233.

— (1944), *Paramecium bursaria*: Life history. I. Immaturity, maturity and age. Biol. Bull. **86**, 131—145.

JENNINGS, H. S., and OPITZ, P. (1944), Genetics of *Paramecium bursaria*. IV. A fourth variety from Russia. Lethal crosses with an American variety. Genetics **29**, 576—583.

KAHL, A. (1935), Urtiere oder Protozoa. I. Wimpertiere oder Ciliata (Infusoria). In: F. DAHL: Die Tierwelt Deutschlands. Jena, Gustav Fischer.

KATASHIMA, R. (1959), Mating types in *Euplotes eurystomus*. J. Protozool. **6**, 75—83.

— (1960), Correlations between nuclear behavior and disposition of the nuclei in cytoplasm during conjugation of *Euplotes patella*. J. Sci. Hiroshima Univ. (B, 1) **18**, 239—263.

KIMBALL, R. F. (1939), Mating types in *Euplotes*. Amer. Naturalist **73**, 451—456.

— (1942), The nature and inheritance of mating types in *Euplotes patella*. Genetics **27**, 269—285.

— (1943), Mating types in the ciliate protozoa. Quart. Rev. Biol. **18**, 30—45.

KÜHN, A. (1959), Über die Wirkungsweise von Erbfaktoren. Arbeitsgemeinschaft für Forschung des Landes Nordrhein-Westfalen **77**, 57—75.

MAUPAS, E. (1888), Recherches expérimentales sur la multiplication des infusoires ciliés. Arch. Zool. exp. gén. **6**, 165—277.

— (1889), Le rajeunissement karyogamique chez les ciliés. Arch. Zool. exp. gén. **7**, 149—517.

METZ, C. B. (1954), Mating substances and the physiology of fertilization in Ciliates. In: Sex in Microorganisms. Amer. Assoc. Adv. Sci., Washington 284—334.

MÜLLER, O. F. (1786), Animalcula Infusoria Fluviatila et Marina. Havniae.

NANNEY, D. L. (1956), Caryonidal inheritance and nuclear differentiation. Amer. Naturalist **90**, 291—307.

Nanney, D. L., and Caughey, P. A. (1953), Mating type determination in *Tetrahymena pyriformis*. Proc. nat. Acad. Sci. Wash. **39**, 1057—1063.

Nanney, D. L., and Rudzinska, M. A. (1960), Protozoa. In: The Cell, edited by J. Brachet and A. E. Mirsky **IV**, 109—150.

Pierson, B. F. (1943), A comparative morphological study of several species of *Euplotes* closely related to *Euplotes patella*. J. Morphol. **72**, 125—165.

Ruthmann, A., und Heckmann, K. (1961), Formwechsel und Struktur des Makronucleus von *Bursaria truncatella*. Arch. Protistenk. **105**, 313—340.

Siegel, R. W. (1956), Mating types in *Oxytricha* and the significance of mating type systems in Ciliates. Biol. Bull. **110**, 352—357.

— and Larison, L. L. (1960), The genic control of mating types in *Paramecium bursaria*. Proc. nat. Acad. Sci., Wash. **46**, 344—349.

Sonneborn, T. M. (1937), Sex, sex inheritance and sex determination in *Paramecium aurelia*. Proc. nat. Acad. Sci., Wash. **23**, 378—385.

— (1938), Mating types in *Paramecium aurelia*: diverse conditions for mating in different stocks; occurrence, number and interrelations of the types. Proc. Amer. Phil. Soc. **79**, 411—434.

— (1939), *Paramecium aurelia*: mating types and groups; lethal interactions; determination and inheritance. Amer. Naturalist **73**, 390—413.

— (1942), More mating types and varieties in *Paramecium aurelia*. Anat. Rec. **84**, 542—543.

— (1947), Recent advances in the genetics of *Paramecium* and *Euplotes*. Adv. Genet. **1**, 263—358.

— (1954), The relation of autogamy to senescence and rejuvenescence in *Paramecium* aurelia. J. Protozool **1**, 38—53.

— (1957), Breeding systems, reproductive methods, and species problems in Protozoa. In: The Species Problem. Amer. Assoc. Adv. Sci., Washington 155—324.

Tuffrau, M. (1960), Révision du genre *Euplotes*, fondée sur la comparaison des structures superficielles. Hydrobiologia **15**, 1—77.

Turner, J. P. (1930), Division and conjugation in *Euplotes patella* Ehrenberg with special reference to the nuclear phenomena. Univ. Calif. Publ. Zool. **33**, 193—258.

Weber, E. (1948), Grundriß der biologischen Statistik. Gustav Fischer, Jena.

Anschrift des Verfassers: Klaus Heckmann, Zoologisches Institut der Universität Tübingen, Hölderlinstraße 12.

Arch. Protistenk. Bd. 106, S. 422—436 (1963)

Nachdruck verboten
Übersetzungsrecht vorbehalten

Aus dem Zoologischen Institut der Universität Tübingen
(Direktor: Prof. Dr. K. G. Grell)

Die Struktur des Chromatins und die Verteilung der Ribonucleinsäure im Makronucleus von *Loxophyllum meleagris*

Von

A. Ruthmann

Mit 2 Abbildungen im Text und Tafel 35 und 36

Inhalt

Einleitung 422
Material und Methoden 424
Ergebnisse 425
Der Kernapparat von *Loxophyllum meleagris* 425
Die Struktur des Chromatins im Makronucleus 427
Chromosomale RNS 429
Nucleolen 430
Diskussion 430
Zusammenfassung 433
Literatur 434

Einleitung

So augenfällig die Differenzierung des Kernapparates der Ciliaten in generative Mikronuclei und somatische Makronuclei auch ist, so wenig wissen wir doch über die cytologischen Grundlagen, auf denen die morphologischen und funktionellen Unterschiede beider Kerntypen beruhen. Der Makronucleus, der bei der Mehrzahl der Ciliaten für die kerngesteuerten Stoffwechselprozesse der Zelle allein verantwortlich ist, hat im Zusammenhang mit seiner Spezialisierung die Fähigkeit zur mitotischen Teilung eingebüßt. Daß sich hinter der „Amitose" dieses Kernes trotzdem wohlgeordnete Vorgänge verbergen mögen, wird durch die Untersuchung von Gall (1959) über den Zusammenhang von regelmäßig über den Kern wandernden Reorganisationsbändern mit der DNS- und Histon-Synthese bei *Euplotes* und die Arbeiten von Kimball und Barka (1959) und Benwitz (unveröffentlicht) über die exakte Halbierung der DNS-Menge bei der Teilung des Makronucleus von *Paramecium*-Arten nahegelegt. Der Verlust der Mitose scheint nicht unmittelbar von dem ge-

Lebenslauf

Als zweiter Sohn des städtischen Vermessungsrates Hans Heckmann und seiner Ehefrau Emma, geb. Sattler, wurde ich am 20. August 1934 in Mannheim geboren.

Nach einer durch den Krieg mehrfach unterbrochenen Volksschulzeit und 9 Jahren Realgymnasium legte ich am 31. März 1955 die Reifeprüfung am Tulla-Gymnasium in Mannheim ab.

Mein Studium begann ich im Sommersemester 1955 an der Ruprecht-Karl-Universität Heidelberg mit den Fächern Zoologie, Botanik, Physik und Chemie. Hier wurde ich der Studienstiftung des deutschen Volkes vorgeschlagen und im März 1958 von ihr als Mitglied aufgenommen. Dies ermöglichte mir, die Universität zu wechseln und mein Studium ab Sommersemester 1958 an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen fortzusetzen. Hier habe ich mich neben Zoologie vor allem mit Physiologischer Chemie und Mikrobiologie beschäftigt. Im Sommer 1958 begann ich bei Professor Dr. K. G. Grell mit einer experimentellen Doktorarbeit zu dem Thema Konjugation und Paarungstypen bei Ciliaten, die ich im Frühjahr 1962 abschloß.

Am 30. April 1960 habe ich geheiratet. Meine Frau Katharina geb. Schmelzer arbeitet z. Z. als Gerichtsreferendarin beim Landratsamt Tübingen.

Seit Mai 1961 bin ich als wissenschaftliche Hilfskraft am Zoologischen Institut der Universität angestellt.

Während meines Studiums habe ich Vorlesungen und Kurse bei folgenden Professoren und Dozenten besucht:

Appel, Beermann, Brix, Duspiva, Friedrich-Freksa, Gadamer, Gierer, Gieseler, Goehring, Grell, Habs, Hassenstein, Hauenschild, Haxel, Heitz, Huber, Kaudewitz, Kopfermann, Krüger, Lethré, Lingens, Ludwig, Lüdicke, Möhres, Nast, Peters, Portmann, Querner, Rauh, Reznik, Riesler, Schindewolf, Schmidt, Schwartz, Seybold, Steiner, Weitzel, Wittig, Zimmer.